



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

Universidad Nacional de La Plata

Trabajo final de carrera

“Estudio de la virulencia de aislados de *Stemphylium*
lycopersici”

Alumno: Analuz Balbi

Carrera: Ingeniería Agronómica

Número de legajo: 26666/9

Correo electrónico: analuzbalbi@hotmail.com

Director: Dra. Rocio Medina

Co-Director: Ph.D. Pedro Alberto Balatti

Fecha de entrega: 27 de Noviembre de 2018

INDICE

RESUMEN.....	3
1. Introducción.....	4
1.1. Generalidades	4
1.2. El cultivo de tomate en la República Argentina.....	5
1.3. El cultivo bajo cubierta	6
1.4. Enfermedades	7
1.5. Mancha gris de la hoja del tomate.....	8
2. Hipótesis y objetivos	12
2.1. Hipótesis de trabajo	12
2.2. Objetivo general.....	12
2.3. Objetivos específicos.....	12
3. Materiales y métodos	13
3.1. Material Biológico.....	13
3.2. Cultivo <i>in vitro</i>	13
3.3. Estudio del crecimiento	14
3.4. Extracción de ADN genómico	14
3.5. Variabilidad genética.....	15
3.6. Estudio de sobrenadantes provenientes de cultivos líquidos.....	16
3.7. Estudio de sobrenadantes provenientes de cultivos líquidos suplementados.....	17
3.8. Estudio de las propiedades fotoquímicas de metabolitos de bajo peso molecular	17
3.9. Bioensayo	18
4. Resultados	19
4.1. Crecimiento y cultivo <i>in vitro</i>	19
4.2. Variabilidad genética.....	20
4.3. Estudio de las propiedades fotoquímicas de metabolitos de bajo peso molecular	21
4.4. Bioensayo	26
5. Discusión	31
6. Conclusiones.....	35
7. Bibliografía.....	36

RESUMEN

Stemphylium lycopersici es uno de los agentes causales de la Mancha gris de la hoja del tomate, patología que reduce el rendimiento del cultivo de tomate. Los hongos del complejo *Stemphylium* secretan metabolitos secundarios, entre los que se incluyen toxinas que son factores de virulencia. En esta tesis se estudió la variabilidad morfológica y genética de 3 aislados que difieren en su virulencia y el efecto biológico de sus sobrenadantes ultrafiltrados cuando ellos se cultivan en un medio líquido basal (extracto de papa-glucosa, PG) y en presencia de un potencial inductor de la virulencia (macerado de hoja de tomate susceptible). Los sobrenadantes de cultivos líquidos de los aislados de *S. lycopersici* se estudiaron con técnicas fotoquímicas.

No se encontró asociación entre la variabilidad morfológica y genética de los hongos estudiados y la actividad fitotóxica de los sobrenadantes de sus cultivos líquidos. Los distintos aislados secretaron moléculas capaces de producir la sintomatología característica de la Mancha gris de la hoja en pruebas *in vitro* utilizando folíolos. Los cambios detectados en los sobrenadantes se correspondieron con los cambios observados en los ensayos de toxicidad en hoja desprendida. Por otro lado, la composición del medio de cultivo de los hongos condicionó la síntesis de los metabolitos extracelulares. La inducción de virulencia provocada por el macerado de hojas es una interacción específica ya que esto solo ocurrió en 2 de los aislados estudiados.

1. Introducción

1.1. Generalidades

El tomate es una planta dicotiledónea, perteneciente a la familia Solanaceae (*Solanum lycopersicum* L.) originaria de América del Sur, en regiones de Chile, Ecuador y Colombia. Su domesticación se inició en el sur de México y norte de Guatemala, y luego en el siglo XVI se introdujo en Europa. Se cree que en un principio la planta de tomate se utilizó como ornamental y ya a mediados del siglo XVIII se cultivó para su aprovechamiento como alimento, principalmente en Italia (Argerich y Troilo, 2011).

A partir del siglo XIX adquirió gran importancia económica mundial, hasta llegar a ser, junto con la papa, la hortaliza más difundida en el mundo (Jones, y col., 2014; FAOSTAT, 2015). Si bien *Solanum lycopersicum* L. es la especie más cultivada, existe un número importante de especies silvestres relacionadas.

El tomate es una planta perenne, pero los cultivos son anuales. Su sistema radical está conformado por una raíz principal con ramificaciones secundarias lo que es acompañado por el desarrollo de raíces adventicias que desarrollan en la base de los tallos. Posee un tallo anguloso con pelos o tricomas. El porte de la planta es erguido al inicio de su ciclo, aproximadamente hasta la emisión de la séptima hoja verdadera, pero a partir de allí adopta un hábito decumbente o rastrojero. Es una especie en la que se encuentran individuos con dos tipos de crecimientos distintos, determinado e indeterminado. La planta tiene hojas compuestas e imparipinadas constituidas por 7 a 9 folíolos, cuya disposición sobre el tallo es alterna. El tomate es una planta autógama con flores hermafrodita completa. El fruto del tomate es una baya de coloración rojiza en la madurez, aunque algunas variedades pueden presentar distintas coloraciones, como amarillas o marrones. Los diámetros de frutos son variables, entre de 1 y 15 cm (Argerich y Troilo, 2011).

El tomate da un fruto que tiene diversos usos ya que es apto tanto para consumo en fresco o en conserva. Por otra parte se adapta a una amplia diversidad de climas y suelos, lo que resultó fundamental en su rápida y extensa difusión a través de distintos lugares del mundo (Argerich y Troilo, 2011).

La producción mundial de tomate es de alrededor de 165 millones de toneladas, en una superficie de 4,7 millones de hectáreas. Entre los principales países productores se ubican China e India, con el 42 % de la producción total, seguidos por Estados Unidos, Turquía y Egipto (FAO, 2013).

1.2. El cultivo de tomate en la República Argentina

Según los datos del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INDEC), en Argentina en el año 2002 se destinaron para realizar cultivos bajo cubierta 2.961 hectáreas, de las cuales el 40 % se cultivó con plantas de tomate. Si bien el cultivo se desarrolló en casi todo el país, un 87,7 % de la superficie nacional destinada a esta producción se concentró en las Provincias de Corrientes y Buenos Aires.

En la provincia de Buenos Aires existen dos grandes zonas de producción de tomate. Una es el cinturón verde que rodea a la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y La Plata, donde se destacan los municipios de La Plata y Florencio Varela y la otra en el cinturón verde de Mar del Plata que se encuentra en el municipio de General Pueyrredón. La producción de tomate bajo cubierta tiene la particularidad de poder ingresar al mercado en momentos en que se produce una baja en la oferta del producto, entre los meses de abril noviembre, permitiendo obtener así un mayor precio (Corvo Dolcet, 2005).

Ya en el año 2005, según los datos del Censo Provincial Hortiflorícola, en la región de La Plata se destinaron más de 1.200 hectáreas al cultivo bajo cubierta, al menos 400

de las cuales destinadas al cultivo de distintas variedades de tomate, sumando una producción total de 31.000 toneladas de tomate en la región.

El Cinturón Hortícola del Gran La Plata es la principal área de producción de tomate de la Provincia de Buenos Aires. Este abastece de verduras frescas a uno de los sectores con mayor población de la Argentina, la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y el Conurbano Bonaerense, con una población de alrededor de 10 millones de personas (Cieza, 2004). El cinturón hortícola platense durante años se destacó por la producción del tomate platense, el cual se caracteriza por su rusticidad y por las cualidades organolépticas de sus frutos (Entio y Mujica, 2016).

1.3. El cultivo bajo cubierta

En el cinturón hortícola platense se incorporó a los invernáculos como tecnología de cultivo, lo que condujo a un aumento en la producción (Gomez y col., 2000, Figura 1.I).

El cultivo bajo cubierta se adoptó no solo para incrementar los niveles productivos sino también para producir tomate en condiciones climáticas desfavorables para el cultivo o para lograr precocidad en ciertas especies. En otras se adoptó para producir de forma tardía y lograr una mayor seguridad de cosecha por la protección que ofrece el invernáculo (Iglesias, 2002).



Figura 1.I. Cultivo de Tomate bajo cubierta; La Plata.

El cultivo bajo cubierta obligó a implementar avances tecnológicos que, si bien tuvieron un impacto positivo en la productividad, bajo los nuevos ambientes generaron condiciones conducentes a la aparición de nuevas patologías, a veces más severas

que en el cultivo tradicional a campo. Esto último obedece principalmente a las diferencias en el manejo del cultivo, período de siembra, las variaciones climáticas, nutricionales y fisiológicas, entre otros factores que predisponen las plantas a la infección de los agentes patógenos (Marrero, 2003; Vida y col., 2004).

El ambiente que se genera por las condiciones de cultivo bajo cubierta, con condiciones tales como elevada humedad (> 60 %) y temperatura (> 25°C) (Jones y col., 2014) resulta ser propicio para el desarrollo de enfermedades foliares que se traducen en la reducción de productividad de la producción de tomate.

1.4. Enfermedades

De la misma manera que el resto de los cultivos, la producción de tomate es afectada por un conjunto de enfermedades y plagas. En términos generales, las plantas se mantienen sanas cuando no sufren estrés por los agentes bióticos y abióticos. Cuando las condiciones climáticas o los factores bióticos alteran las funciones fisiológicas de las plantas, éstas desarrollan síntomas que indican que están enfermas y por lo tanto el rendimiento va a ser menor. Las enfermedades son alteraciones fisiológicas provocadas por factores bióticos y/o abióticos que se visualizan con la aparición de los síntomas pero que pueden llevar a la alteración de células y tejidos. De esta manera, los tejidos de las plantas enfermas se debilitan o se necrosan y mueren. Todo esto se traduce en un deterioro parcial del tejido y/o la muerte, que se reflejan en una pérdida de calidad y productividad de la planta (De Wit y col., 2002; Agrios, 2005).

Las enfermedades resultan de la interacción de tres factores a través del tiempo, que pueden definirse a través del triángulo de la enfermedad (Figura 1.II):

- Hospedante: planta.
- Agente causal: Patógeno.
- Medio ambiente: entorno físico químico.

Este ciclo abarca los cambios y síntomas que sufre una planta como los que se producen en el patógeno en los periodos o en varias estaciones de crecimiento consecutivas.



Figura 1.II. Triángulo de la enfermedad.

Entre los agentes bióticos y abióticos que pueden causar enfermedades en las plantas se encuentran los virus, las bacterias, los hongos, los protozoos y los nematodos. Entre los factores abióticos se encuentran las condiciones ambientales desfavorables, como falta o exceso de nutrientes, humedad y luz y presencia de productos químicos tóxicos. La importancia de los agentes patógenos en el país cambia según las zonas de cultivo y esto se debe a que las patologías surgen de la interacción del genotipo del patógeno, de la planta y del ambiente en el que ocurre la interacción. Es decir que los patógenos y las plantas hospedantes conviven, pero sólo cuando las condiciones ambientales son predisponentes para la infección de la planta y el desarrollo del patógeno se produce la enfermedad (Agrios, 2005).

Particularmente, las patologías fúngicas ocupan un lugar preponderante, tanto por la diversidad de agentes patógenos como por su carácter endémico (Jones y col., 2014). En los últimos años el moho de la hoja (*Fulvia fulva*) y la Mancha gris de la hoja (*Stemphylium lycopersici*) se ubicaron entre las patologías más relevantes del cultivo de tomate (Thomma y col., 2005; Ronco y col., 2008; Franco y col., 2017).

1.5. Mancha gris de la hoja del tomate

La Mancha gris de la hoja del tomate es una enfermedad causada por diferentes especies del género *Stemphylium* (anamorfo de *Pleospora* spp.) sobre diferentes *Solanum* spp., tales como *S. solani*, *S. lycopersici* y *S. botryosum* (Jones y col., 2014; Miranda y col., 2010). Recientemente se demostró que *Stemphylium lycopersici* es el

principal agente causal de la Mancha gris de la hoja del tomate en la Argentina (Franco y col., 2017).

Stemphylium sensu lato es un taxón establecido en el año 1833 (Wallroth, 1833) que incluye más de 150 especies saprótrofas y patogénicas (polífagas) de plantas. Taxonómicamente, *Stemphylium* se ubica dentro del reino Fungi, phylum Ascomycota, subphylum Pezizomycotina, clase Dothideomycetes, orden Pleosporales, familia Pleosporaceae.

Los hongos del complejo *Stemphylium* pueden crecer como saprótrofos en el suelo y/o en el rastrojo. El hongo presenta diferentes hospedantes alternativos de la familia Solanáceas. Se diseminan a través de sus esporas (conidios) con las corrientes de aire y de las salpicaduras de agua. La permanencia de este hongo en un cultivo y su transmisión a otro es a través de material de tomate infectado (Argerich y Troilo, 2011). Además, la superposición de cultivos de un año a otro permite que se produzcan reinfecciones. También es importante la supervivencia del inóculo en plantas abandonadas (Bernal, 2010). Dada la naturaleza saprótrofa del patógeno, los desechos de la cosecha deben ser eliminados para evitar su diseminación en los cultivares de tomate (Rosa, 2007).

Las condiciones que predisponen o favorecen la infección del hongo son las temperaturas entre 24 a 27 °C, la presencia de una película de agua en la hoja y/o una elevada humedad relativa. (Ronco y col., 2008). La Mancha gris de la hoja se caracteriza por el desarrollo de pequeñas manchas ligeramente angulares (2-10 mm de diámetro) inicialmente pardas cuyo centro llega a ser más claro (gris) y se separa observándose en la periferia de las manchas un amarillamiento del limbo que se extiende a toda la hoja en ataques severos, reduciendo así el área fotosintética de la planta y comprometiendo la productividad (Ronco y col., 2008).

La Mancha gris de la hoja aumentó su incidencia en los últimos años (Das y col., 2017), y se ha detectado la mayor agresividad del patógeno en estadios fenológicos tempranos del desarrollo de la planta. Esta enfermedad está distribuida mundialmente, y particularmente en plantaciones donde se presentan condiciones de alta temperatura y humedad relativa, se convierte en una enfermedad destructiva (Blancard, 2012; Jones y col., 2014; Farr y Rossman, 2015).

La Mancha gris de la hoja del tomate se puede controlar con fungicidas y, a pesar de que existen algunos cultivares de tomate resistentes (Behare y col., 1991; Yang y col., 2017), en el mercado regional no hay antecedentes sobre la respuesta de los híbridos comerciales a este patógeno.

En las interacciones planta-patógeno, los hongos sintetizan diferentes compuestos, entre ellos metabolitos secundarios de bajo peso molecular y proteínas, considerados agentes de compatibilidad que son determinantes de la patogenicidad o de la virulencia (Shah, 2009; Tan, 2017). Existe una relación entre el ciclo de vida de los hongos fitopatógenos y el pool de metabolitos que éstos sintetizan durante la interacción con la planta, siendo más amplio el espectro de metabolitos sintetizados por los hongos necrótrofos comparado al producido por hongos biótrofos y hemibiótrofos (Griffiths y col., 2018). En términos generales, el desarrollo de la enfermedad depende de lo que ocurre en la fase inicial de la infección (Doehlemann y Hemetsberger, 2013). En esta etapa los hongos sintetizan y secretan moléculas que aumentan su capacidad patogénica (factores de virulencia), que en muchos casos pueden desencadenar respuestas de defensa en la planta (Yang y col., 2017; de Jonge y col., 2012).

Los hongos necrótrofos pertenecientes al género *Stemphylium* han sido citados como una fuente de diferentes metabolitos secundarios, incluyendo toxinas como Stemfilina, Stemfiloxina II, Stemfiperinelol y Stemfol, entre otras (Andersen y col., 1995). Estas

toxinas son, en los hospedantes susceptibles, factores de virulencia que cumplen un rol clave en el proceso de la patogénesis.

Algunas de las toxinas de *Stemphylium* exhiben fitotoxicidad contra varias especies vegetales, tales como la Stemfiloxina I y la SS-toxina, mientras que otras como las SV-toxinas de *Stemphylium vesicarium* son específicas de hospedante (Singh y col., 2000; Zheng y col., 2010). Este tipo de metabolitos son considerados disparadores de la resistencia sistémica adquirida (RSA), que incluye reacciones de hipersensibilidad en hospedantes resistentes y niveles variables de la enfermedad en hospedantes susceptibles (Shah, 2009; Kusajima y col., 2017).

A pesar de los esfuerzos realizados en distintos grupos de investigación, no se conoce en detalle la estructura química de estos metabolitos y/o su modo de acción (Zheng y col., 2010), así como tampoco la relación de la virulencia / agresividad de *Stemphylium* y el tipo y cantidad de las toxinas sintetizadas.

En este sentido, el estudio de los metabolitos secundarios sintetizados por aislados de *Stemphylium* con diferente virulencia en distintas condiciones permitirá generar conocimiento de las variables que puedan estar involucradas en los métodos de control biológico o químico del patógeno en un marco de agricultura sustentable y amigable para el ambiente.

2. Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis de trabajo

- a) *Stemphylium lycopersici* secreta metabolitos secundarios que son factores de virulencia que interaccionan con la planta de tomate.
- b) Estos factores de virulencia (metabolitos secundarios) son producidos por el hongo cuando éste interacciona con moléculas que libera la planta.

2.2. Objetivo general

Adquirir entrenamiento en prácticas de laboratorio, particularmente en técnicas microbiológicas, químicas, genéticas y de interacción planta-fitopatógeno a través del estudio de los sobrenadantes extracelulares de cultivos líquidos de aislados de *Stemphylium lycopersici* que difieren en su capacidad de enfermar y/o esporular.

2.3. Objetivos específicos

- 1) Comparar el crecimiento de aislados de *Stemphylium lycopersici* que difieren en su capacidad de enfermar y/o esporular cuando son cultivados en un medio agarizado.
- 2) Caracterizar fotoquímicamente los sobrenadantes de cultivos líquidos de aislados seleccionados de *S. lycopersici* a lo largo del tiempo y en respuesta a la suplementación de un macerado de hojas de tomate de un cultivar susceptible.
- 3) Analizar la respuesta *in vitro* de folíolos de tomate de un cultivar susceptible a la enfermedad a la aplicación de sobrenadantes ultrafiltrados de aislados de *S. lycopersici*.

3. **Materiales y métodos**

3.1. **Material Biológico**

El material fúngico que se utilizó son distintas cepas de *Stemphylium lycopersici*, pertenecientes al cepario del Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI), que se aislaron de plantas de tomate (cv. Elpida F1) provenientes de Bella Vista (Corrientes) y La Plata (Buenos Aires) que presentaban sintomatología típica de la mancha gris de la hoja del tomate. Para realizar los objetivos propuestos se evaluaron 3 cepas que difieren en su virulencia. Como ejemplar de aislado muy virulento se empleó la cepa CIDEFI 216, con alto grado de esporulación; y como representantes poco virulentos los aislados CIDEFI 212 y CIDEFI 213. Así mismo, los aislamientos poco virulentos difieren en su capacidad de esporulación, siendo el aislado CIDEFI 212 no esporulante (en medio agar papa glucosa) mientras que el aislado CIDEFI 213 posee alta esporulación.

3.2. **Cultivo *in vitro***

La composición de los medios de cultivo empleados se presenta en las tablas 1-3. Estos medios se esterilizaron mediante autoclavado (121° C, 20 minutos).

Para la preparación del medio agar papa glucosa (APG) y papa glucosa (PG), 200 g de papa se hirvieron en 1 litro de agua durante 1 hora. Luego, se realizó la filtración a través de una malla de tela, se agregaron 20 g de glucosa y se llevó a volumen (1 litro).

Tabla 1. Composición del medio agar papa glucosa, APG [g.L⁻¹].

Ingrediente	Cantidad [g.L ⁻¹]
Papa	200
Glucosa	20
Agar	17
Agua	<i>c.s.p</i>

Tabla 2. Composición del medio papa glucosa, PG [g.L⁻¹].

Ingrediente	Cantidad [g.L ⁻¹]
Papa	200
Glucosa	20
Agua	c.s.p

Tabla 3. Composición del medio agar V8, AV8 [g.L⁻¹].

Ingrediente	Cantidad
Jugo V8*	200 ml
CaCO ₃	2 g
Agar	17 g
Agua	200 ml

*V8 vegetable Juice® (Campbell Soup Company, Camden NJ, USA)

Los aislados CIDEFI-212, CIDEFI-213 y CIDEFI-216 se conservaron en los medios APG y agar V8 (AV8), suplementados con 160 µg de kanamicina (10 mg/ml), la cual se esterilizó mediante la técnica de filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0.22 µm (OSMONICS®, GE Betz, Trevose PE, USA).

3.3. Estudio del crecimiento

Se inoculó un disco de material fúngico (6 mm) correspondiente a los distintos aislados sobre placas conteniendo medio AV8. Las placas se incubaron durante 7 días a 25 °C en oscuridad. Se midió el diámetro de las colonias desarrolladas luego de 3, 5 y 7 días. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y separación de medias mediante test de Tukey utilizando el programa estadístico InfoStat (v72015v1) (Di Rienzo y col., 2015, FCA, UNC, Córdoba, Argentina).

3.4. Extracción de ADN genómico

Se realizó la extracción de ADN de los aislados, utilizando el kit *Wizard® Genomic DNA Purification kit* (Promega Corporation, Fitchburg, WN, USA). Las muestras se

congelaron con nitrógeno líquido, y se molieron en morteros estériles hasta obtener polvos homogéneos. Cuatrocientos mg de este polvo se pasaron a tubos eppendorf estériles, se le adicionó a cada uno 600 µl de la solución de lisis nuclear, y se mezclaron en vórtex durante 1-3 segundos. Luego se incubaron 15 minutos a 65°C. Posteriormente se les adicionó 3 µl de RNasa (10µg µl⁻¹) y se incubaron a 37°C durante 15 minutos. A continuación, se le agregaron a cada muestra 200 µl de Solución de Precipitación Proteínas y se mezclaron 20 segundos en vórtex. Luego de centrifugar 3 minutos a 16.000 g, se transfirieron los sobrenadantes a tubos de 1,5 ml. Con el fin de precipitar los ADNs se les adicionó isopropanol (1 volumen), se mezcló y luego se centrifugó a 16.000 g. Se descartaron los sobrenadantes y los pellets se lavaron con 600 µl de etanol 70 % y se secaron durante 15 minutos. El ADN se disolvió en un volumen de 40 µl de solución de rehidratación a 65°C durante 1 hora. La integridad del ADN de las distintas muestras se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (1 % p/v) suplementado con bromuro de etidio (10 % p/v) a 90 voltios durante 30 minutos (Sambrook y col., 1989). La visualización del ADN se realizó por irradiación con luz UV. El ADN se cuantificó en base a la comparación de la intensidad de la banda del ADN genómico con las del marcador molecular control (Genoma del fago lambda digerido con Hind III - Promega Biotech). Los geles se documentaron utilizando el analizador de imágenes SYNGENE y el software GENETOOLS.

3.5. Variabilidad genética

Utilizando el ADN molde de los aislados utilizados como inóculos se comparó el perfil genético mediante el uso de marcadores moleculares ISSR (*inter-simple sequence repeat*).

Para ello se realizaron amplificaciones de ISSR mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) empleando los *primers* AA₅, AN, BA₃, GA₅ y LA₅. Las reacciones se

llevaron a cabo utilizando 1 µl de ADN molde (12 ng), 2,5 mM de cloruro de magnesio; 1 µM de *primer*, 0,2 mM de cada dNTP, 1X de *buffer*, 1,25 unidades de T-*plus* ADN polimerasa, en un volumen final de 25 µl.

El ciclo de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 7 min y 33 ciclos de desnaturalización de 1 min a 94°C, *annealing* de 75 seg a 48°C (*primers* AA₅, AN, GA₅, BA₃) o 53°C (*primer* LA₅), y una extensión de 4 min a 72°C y a esto se le adicionó un ciclo de extensión final de 7 min a 72°C. Se utilizó un termociclador modelo *Multigene*[®] (*Labnet International, Inc.*, Edison, NJ, USA).

Los fragmentos de ADN, productos de la amplificación por ISSR-PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa 1.5 % (p/v) teñidos con bromuro de etidio (10 % p/v) a 90 voltios durante 4 horas. La visualización de las bandas de ADN se realizó por irradiación con luz UV y se contrastaron con un marcador de peso molecular (Genoma del fago lambda digerido con Hind III - *Promega Biotech*). Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el software GENETOOLS, para finalmente calcular los valores de similitud y distancias génicas utilizando los perfiles de bandas ISSR, a través de índice de similitud Sorensen-Dice (Dice, 1945). Este índice implica que, si una banda está presente, los *loci* donde se alinea el primer en ambos lados de la banda está presente. Además, se incluyó en cada gel la amplificación correspondiente utilizando ADN de *Fulvia fulva*, CIDEFI 323, como *outgroup* del análisis.

3.6. Estudio de sobrenadantes provenientes de cultivos líquidos

Los aislados se repicaron a medio APG, donde fueron incubados durante 7 días a 25°C en oscuridad, para posteriormente ser empleados como inóculos. Posteriormente se prepararon Erlenmeyer conteniendo 25 ml de medio PG con 300 µg de kanamicina. Cada Erlenmeyer se inoculó con 1 disco de micelio de 6 mm de diámetro. Una vez inoculados, los cultivos líquidos crecieron en agitación (150 rpm) bajo luz difusa, a

25°C. Los ensayos se realizaron por triplicado. Luego de 7 y 14 días de cultivo, el contenido de cada Erlenmeyer se filtró a través de membranas de nitrocelulosa de 0.22 μm para los ensayos posteriores. De esta manera se obtuvieron los sobrenadantes conteniendo las toxinas a partir de los cultivos líquidos.

3.7. Estudio de sobrenadantes provenientes de cultivos líquidos suplementados

Se estudió el efecto sobre las propiedades de los sobrenadantes de los cultivos cuando los aislados crecen en presencia de un macerado de hoja. El macerado de hoja aporta compuestos vegetales que actúan como potenciales inductores de la virulencia del patógeno. Las hojas provenientes de plántulas de 45 días del cultivar comercial de tomate TL 42524 (de Syngenta) susceptible a *Stemphylium spp*, se lavaron 3 veces con agua destilada estéril, se congelaron con nitrógeno y finalmente se pulverizaron en mortero. Cuatro g del material pulverizado se resuspendieron en 100 ml de agua estéril (concentración final: 4 % p/v). El macerado acuoso se filtró a través de membranas de nitrocelulosa de 0.45 μm similares a las descritas en el punto 3.2 y posteriormente por membranas de 0.22 μm , para ser finalmente añadido al medio PG. Luego se repitió el procedimiento descrito en el inciso 3.6, suplementando cada Erlenmeyer con 1 ml de macerado de hoja ultrafiltrado.

3.8. Estudio de las propiedades fotoquímicas de metabolitos de bajo peso molecular

Se realizó el espectro UV-Vis entre 200 y 800 nm de los sobrenadantes ultrafiltrados, empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV- 1800 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Como blanco de la medida se utilizó el espectro del medio sin inocular, previamente ultrafiltrado. Tomando como referencia los datos bibliográficos (Andersen

y col., 1995; Nielsen y Smedsgaard, 2003; Debbab y col., 2009; Zheng y col., 2010), se buscaron diferencias en las longitudes de onda que se corresponden con moléculas ya descritas, en aquellos sitios donde distintos metabolitos presentan máximos de absorción, así como en el espectro completo. Los espectros de fluorescencia se realizaron utilizando un espectrofluorómetro Fluorolog-3[®] (Horiba Ltd., Kyoto, Japan) midiendo la emisión entre 260 a 650 nm. Las matrices de excitación-emisión de fluorescencia (MEEF) se generaron a partir de espectros de emisión obtenidos, incrementando cada 5 nm la longitud de onda de excitación, desde 240 hasta 580 nm (Medina y col., 2018).

3.9. Bioensayo

Nueve folíolos de plantas de tomate TL 42524 de 45 días se trataron por cada sobrenadante ultrafiltrado, con el lado adaxial de la hoja sobre 2 hojas de papel de filtro embebido con 3 ml agua estéril, dentro de una placa de Petri de plástico, siguiendo la metodología empleada por Franco y col. (2017). Sobre la cara abaxial se practicaron tres lesiones equidistantes, empleando un tip estéril, y cada lesión se trató con 30 µl del sobrenadante ultrafiltrado correspondiente. A los 5 días de iniciado el ensayo, se determinó el área de la lesión promedio utilizando el software de análisis de imágenes para la cuantificación de las enfermedades de las plantas Assess 2.0 (Lamari, 2008, American Phytopathological Society, Saint Paul, MI, USA).

Los controles del ensayo consistieron en aplicaciones de agua estéril y de medio de cultivo sin inocular previamente ultrafiltrado.

Los resultados fueron interpretados por un análisis de varianza (ANOVA) y separación de medias mediante test de Tukey utilizando el programa estadístico InfoStat (v72015v1) (Di Rienzo y col., 2015, FCA, UNC, Córdoba, Argentina).

4. Resultados

4.1. Crecimiento y cultivo *in vitro*

Se determinó el diámetro de la colonia los 3 aislados en medio AV8 durante una semana (Figura 4.I). El aislado CIDEFI 212 presentó un diámetro de colonia significativamente menor ($p < 0.05$), al de los aislados CIDEFI 213 y CIDEFI 216.

Durante el ensayo se documentó el crecimiento de los aislados mediante fotografías, de la cara superior y del reverso de las placas de Petri (Figura 4.II). A través del registro puede observarse la diversidad cultural de los aislados, en lo que hace a pigmentación y morfología de las colonias desarrolladas.

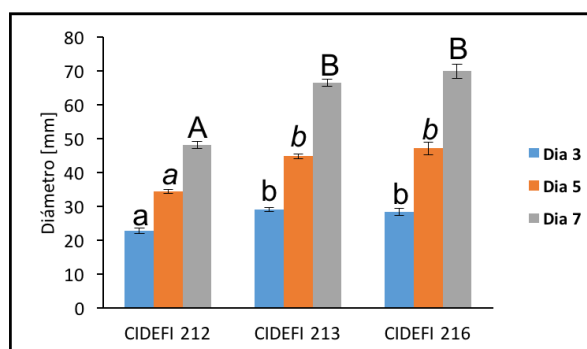


Figura 4.I. Diámetro de las colonias (mm) de los aislados CIDEFI 212, CIDEFI 213 y CIDEFI 216 durante 7 días de crecimiento en medio agar V8. Las letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas entre las cepas, en el mismo día ($p < 0.05$, Test Tukey).

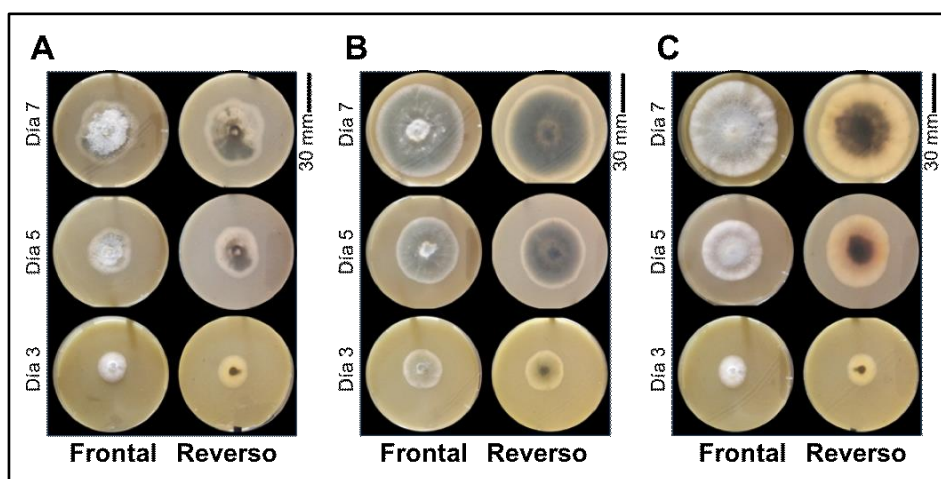


Figura 4.II. Colonias de los aislados en medio agar V8 luego de 3, 5 y 7 días de desarrollo a 25° C en oscuridad. A). CIDEFI 212. B). CIDEFI 213. C). CIDEFI 216.

4.2. Variabilidad genética

La figura 4.III muestra el gel correspondiente a la extracción de ADN genómico total luego de 30 minutos de electroforesis. Como puede observarse, se logró extraer ADN genómico de los aislados, aunque en menor cantidad de CIDEFI 216. Además, se observa en el gel que el ADN se encuentra fragmentado. Luego de cuantificar el ADN se realizaron las correspondientes diluciones para estudiar los perfiles genéticos con marcadores moleculares (10 ng/ μ L).

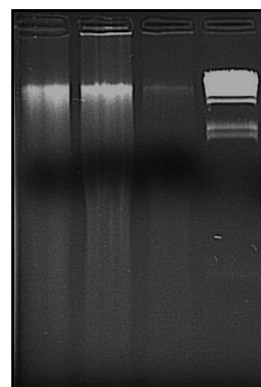


Figura 4.III. Gel de agarosa 1 % (p/v) teñido con bromuro de etidio (10 % p/v) luego de la electroforesis a 90 voltios durante 30 minutos. Calle 1. 1 μ L ADN genómico CIDEFI 212. Calle 2. 1 μ L ADN genómico CIDEFI 213. Calle 3. 1 μ L ADN genómico CIDEFI 216. Calle 4. 3 μ L de marcador de peso molecular λ -HindIII.

El perfil genético de cada aislado se evaluó mediante la amplificación de secuencias repetitivas (ISSR, *inter-simple sequence repeat*) empleando los *primers* AA₅, AN, BA₃, GA₅ y LA₅. En la figura 4.IV se muestran los

fingerprints de los aislados que se obtuvieron con los *primers* ISSR en dos geles de agarosa.

A partir de los *fingerprints* se calcularon los valores de similitud y distancias genéticas, a través de índice de similitud Dice, para construir el dendrograma correspondiente (Figura 4.V). Como puede observarse, los aislados son genéticamente distintos con al menos un 0.4 % de variabilidad genética (0.6 % de similitud, Figura 4.V.A). Además, a nivel genético los aislamientos CIDEFI 212 y CIDEFI 216 mostraron mayor similitud (0.675 % aproximadamente).

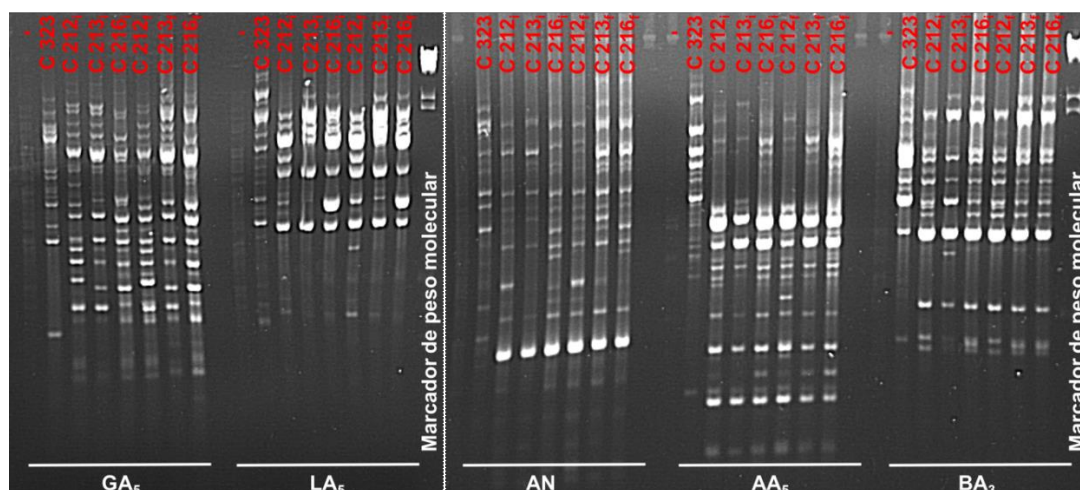


Figura 4.IV. Geles de agarosa 1.5 % (p/v) teñidos con bromuro de etidio (10 % p/v), luego de 4 horas de electroforesis a 90 voltios.

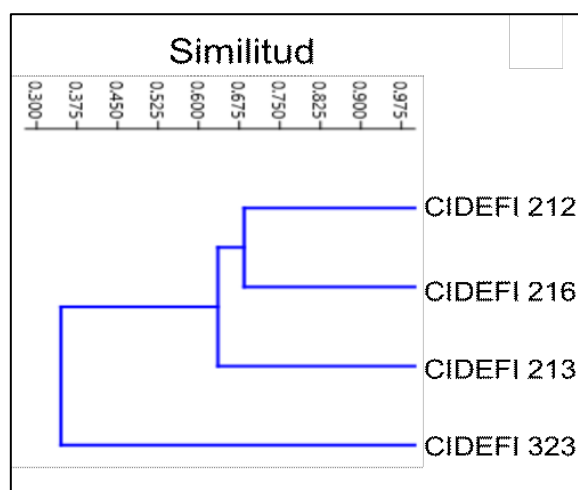


Figura 4.V. Dendrograma obtenido a partir del análisis de los perfiles genéticos (*fingerprints*) de los aislados. En el eje se grafica la similitud genética.

4.3. Estudio de las propiedades fotoquímicas de metabolitos de bajo peso molecular

Se presentan a continuación los resultados del estudio de las propiedades fotoquímicas de los sobrenadantes ultrafiltrados provenientes del crecimiento en medio papa glucosa de los distintos aislados, al día 7 (Figura 4.VI), al día 7 con

macerado de hoja (Figura 4.VII), día 14 (Figura 4.VIII) y al día 14 con macerado de hoja (Figura 4.IX).

Al día 7, los sobrenadantes ultrafiltrados de los aislados CIDEFI 212 y CIDEFI 216 mostraron un máximo de absorción cercano a 275 nm, que además fue de magnitud similar. Por su parte el sobrenadante ultrafiltrado proveniente del aislado CIDEFI 213 mostró un máximo de absorbancia en la misma región, aunque con un valor de absorbancia menor. El sobrenadante correspondiente al aislado CIDEFI 212 mostró una región de absorbancia adicional entre los 400 y los 470 nm (Figura 4.VI).

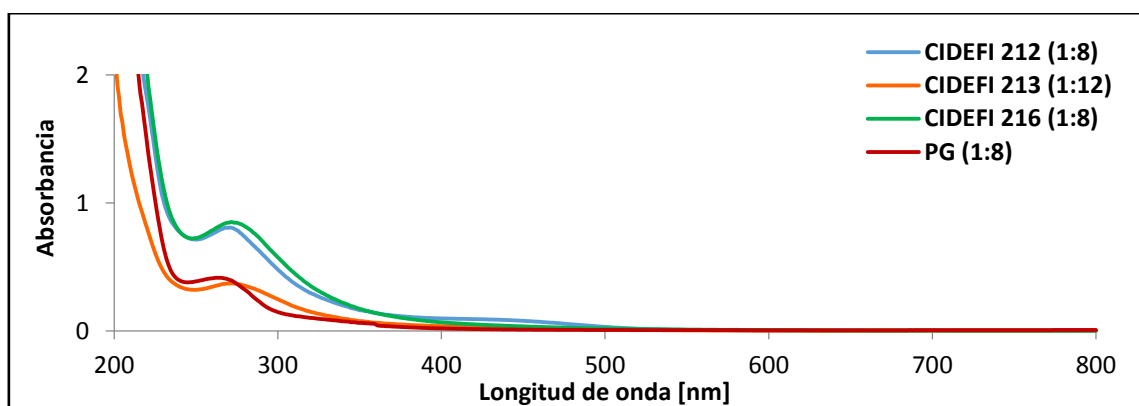


Figura 4.VI. Espectros UV-Vis de los sobrenadantes ultrafiltrados de los aislados luego de 7 días de crecimiento en medio papa glucosa (PG).

El espectro correspondiente al sobrenadante ultrafiltrado proveniente del crecimiento del aislado CIDEFI 212 en medio papa glucosa suplementado con macerado de hoja al día 7 mostró un máximo de absorbancia próximo a los 270 y 290 nm, y una región de absorción entre los 370 y 500 nm. Los espectros correspondientes a los aislados CIDEFI 213 y CIDEFI 216 no mostraron mayores cambios con respecto al control (Figura 4.VII).

Luego de 14 días de crecimiento en medio papa glucosa, los sobrenadantes ultrafiltrados de los 3 aislados mostraron un máximo de absorbancia próximo a los 270

nm, el cual fue de mayor altura para el aislamiento CIDEFI 212. El máximo de absorción correspondiente al sobrenadante del aislado CIDEFI 213 fue menos definido debido a la mayor amplitud de la base del pico. De modo indistinto, los 3 sobrenadantes mostraron una zona de absorción diferencial con respecto al control, entre los 370 y 500 nm (Figura 4.VIII).

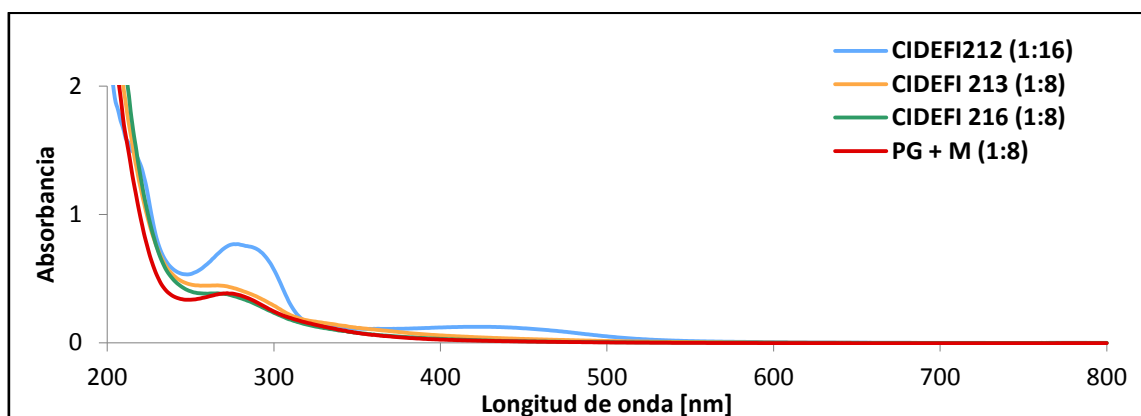


Figura 4.VII. Espectros UV-Vis de los sobrenadantes ultrafiltrados de los aislados luego de 7 días de crecimiento en medio papa glucosa suplementado con macerado de hoja (PG + M).

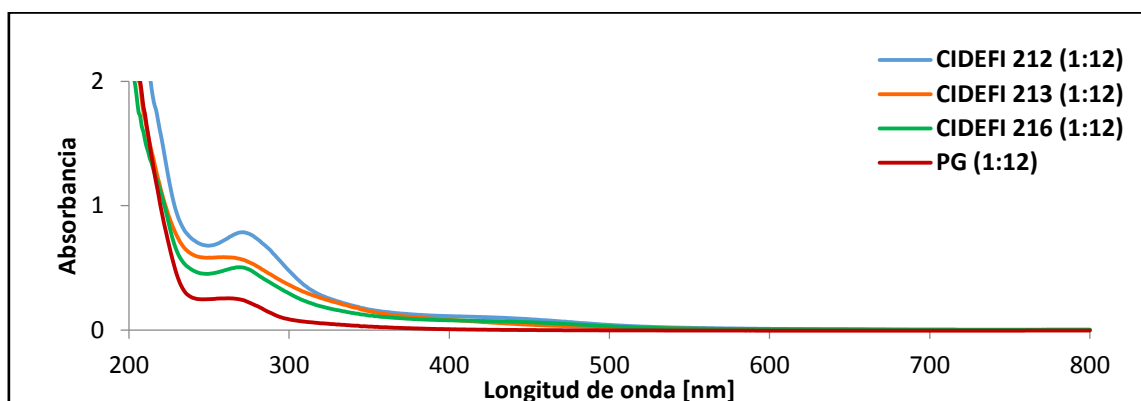


Figura 4.VIII. Espectros UV-Vis de los sobrenadantes ultrafiltrados de los aislados luego de 14 días de crecimiento en medio papa glucosa (PG).

En los espectros de los sobrenadantes correspondientes a los cultivos en medio papa glucosa suplementados con macerado de hoja ultrafiltrados al día 14 de los aislados

CIDEFI 212 y CIDEFI 213 se observó un máximo de absorbancia alrededor de los 270 nm, mientras que en el sobrenadante correspondiente al crecimiento del aislado CIDEFI 216 el máximo fue de menor altura. Además, en el sobrenadante del cultivo de CIDEFI 213 se observó una zona adicional de absorbancia entre 300 y 500 nm (Figura 4.IX).

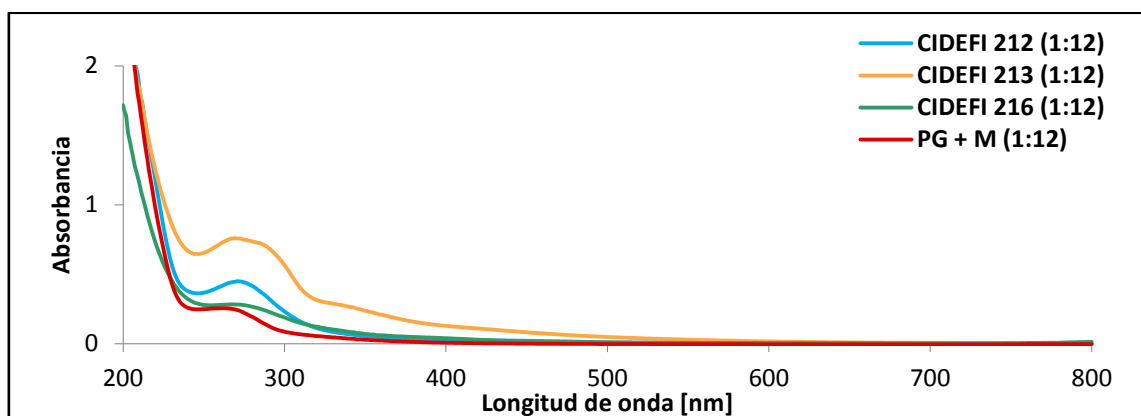


Figura 4.IX. Espectros UV-Vis de los sobrenadantes ultrafiltrados de los aislados luego de 14 días de crecimiento en medio papa glucosa suplementado con macerado de hoja (PG + M).

Con el objetivo de profundizar en el estudio fotoquímico, se realizaron las matrices excitación-emisión de fluorescencia (MEEF) de los sobrenadantes ultrafiltrados (Figura 4.X y 4.XI).

Luego de 7 días de crecimiento en PG no se encontraron mayores diferencias en términos de fluorescencia entre los aislados, con respecto al medio de cultivo sin inocular, acorde a lo observado en los espectros UV-visibles. Sin embargo, luego de 14 días, la región de fluorescencia comprendida entre λ_{exc} 250 - 275 nm tuvo menor intensidad en los sobrenadantes de los aislados CIDEFI 213 y CIDEFI 216, mientras que no se observó en el sobrenadante del cultivo de CIDEFI 212 (Figura 4.X). Adicionalmente, la fluorescencia de todos los sobrenadantes provenientes del

crecimiento de los aislados mostró cambios con respecto al medio sin inocular en la región λ_{exc} 425 / λ_{em} 525 nm.

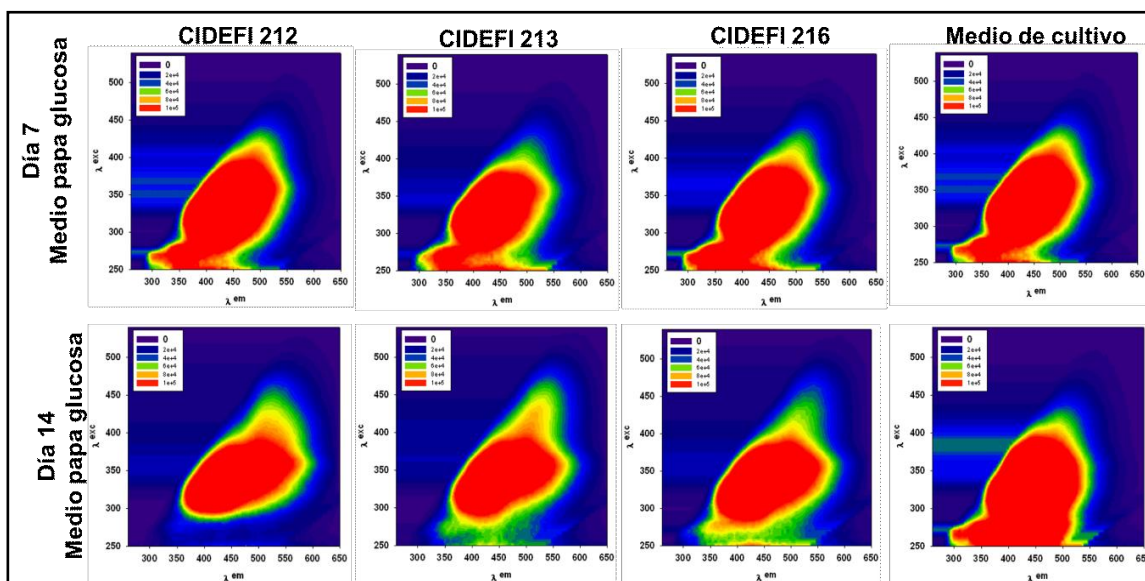


Figura 4.X. Matrices de excitación-emisión de fluorescencia (MEEF) de los sobrenadantes ultrafiltrados luego de 7 y 14 días de crecimiento en medio papa glucosa (PG).

Los sobrenadantes ultrafiltrados de los aislados CIDEFI 213 y CIDEFI 216 luego de 7 días creciendo en medio PG suplementado con macerado de hoja de tomate no mostraron mayores diferencias en términos de fluorescencia con respecto al medio de cultivo sin inocular. Por otro lado, el sobrenadante correspondiente al crecimiento del aislado CIDEFI 212 mostró 2 regiones de emisión de fluorescencia intensa, con máximos comprendidos entre λ_{exc} 300 - 400 nm y λ_{em} 425 - 500 nm (Figura 4.XI).

Luego de 14 días de desarrollo, el sobrenadante ultrafiltrado correspondiente al crecimiento del aislado CIDEFI 213 mostró 3 regiones de máxima fluorescencia, posicionadas alrededor de λ_{exc} 325 nm / λ_{em} 425 nm; λ_{exc} 350 nm / λ_{em} 525 nm y la de menor intensidad, λ_{exc} 450 nm / λ_{em} 525 nm. Finalmente, los sobrenadantes ultrafiltrados correspondientes al desarrollo de CIDEFI 212 y CIDEFI 216 mostraron un

descenso en la fluorescencia en la región λ_{exc} 250 - 300 nm / λ_{em} 450 - 525 nm con respecto al medio sin inocular.

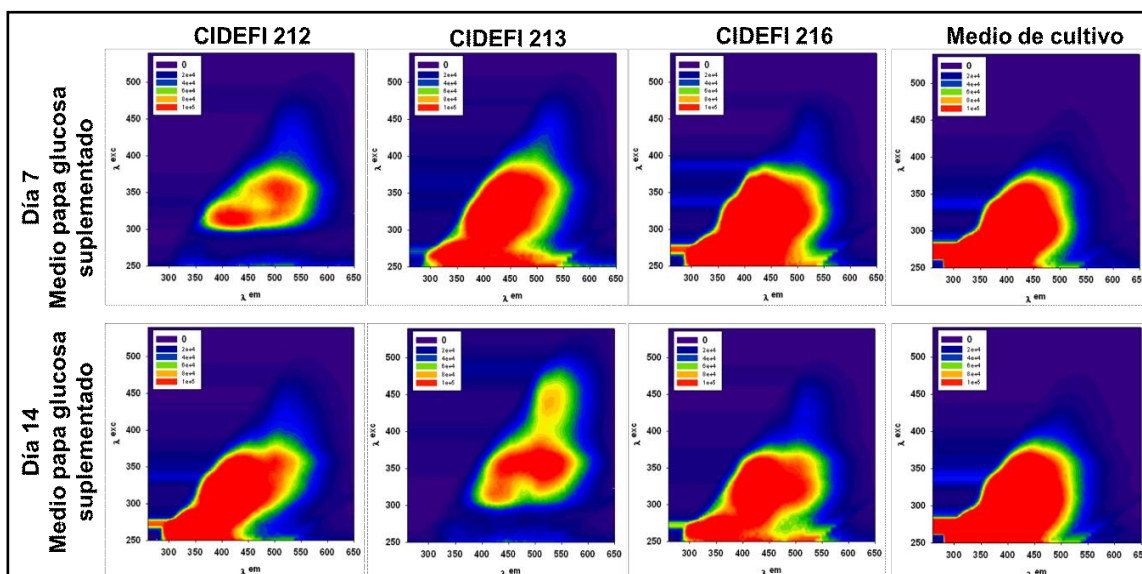


Figura 4.XI. Matrices de excitación-emisión de fluorescencia (MEEF) de los sobrenadantes ultrafiltrados luego de 7 y 14 días de crecimiento en medio papa glucosa suplementado con macerado de hoja (PG + M).

4.4. Bioensayo

Con el objetivo conocer el rol biológico de los compuestos presentes en los sobrenadantes ultrafiltrados previamente caracterizados fotoquímicamente en plantas de tomate susceptibles, se realizó el ensayo de toxicidad en hoja desprendida utilizando folíolos del cultivar comercial susceptible (cv Elpida).

Los sobrenadantes ultrafiltrados provenientes del crecimiento del aislado CIDEFI 212 luego de 7 días de crecimiento en medio PG produjeron necrosis en los folíolos, mientras que los correspondientes a CIDEFI 213 y CIDEFI 216 no mostraron diferencias significativas con respecto al control (PG, Figura 4.XII.A). Luego de 14 días, los sobrenadantes de los tres aislados afectaron el tejido foliar. Vale la pena destacar que entre ellos, el aislado CIDEFI 216 fue el que afectó la mayor área foliar (Figura 4.XII.B).

Cuando los aislados crecieron en medio PG en presencia del macerado de hoja, luego de 7 días de crecimiento los sobrenadantes ultrafiltrados provenientes de los aislados CIDEFI 212 y CIDEFI 213 provocaron el desarrollo de necrosis en el ensayo de hoja desprendida, significativamente distinto al control (Figura 4.XIII. A). Sin embargo, luego de 14 días de ensayo, ningún sobrenadante mostró diferencias significativas en términos de área foliar afectada con respecto al medio sin inocular (Figura 4.XIII.B).

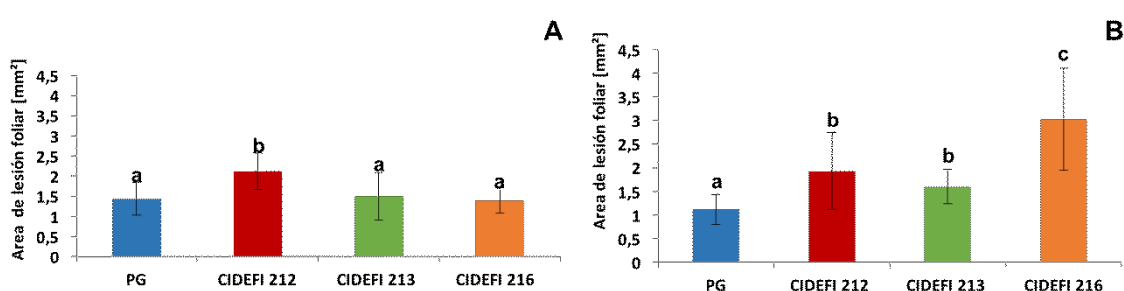


Figura 4.XII. Toxicidad de los sobrenadantes ultrafiltrados provenientes del desarrollo en medio papa glucosa. Las letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$, Test de Tukey). A). Día 7. B). Día 14.

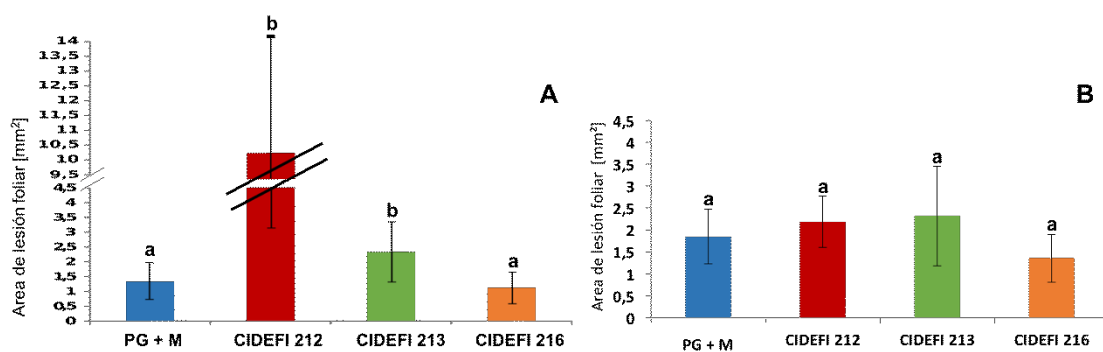


Figura 4.XIII. Toxicidad de los sobrenadantes ultrafiltrados provenientes del desarrollo en medio papa glucosa suplementado con macerado de hoja. Las letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$, Test de Tukey). A). Día 7. B). Día 14.

Resulta interesante que, el sobrenadante ultrafiltrado del aislado CIDEFI 212 cuando creció en medio suplementado con macerado de hoja luego de 7 días provocó mayor necrosis en el ensayo de hoja desprendida, que el correspondiente sobrenadante proveniente del medio sin suplementar (Figura 4.XIV y 4.XV).



Figura 4.XIV. Fotografías de los folíolos luego de 5 días de tratamiento. A). Agua. B). PG. C). PG + M. D). Sobrenadante de CIDEFI 212 luego de 7 días de crecimiento en PG. E). Sobrenadante de CIDEFI 212 luego de 7 días de crecimiento en PG + M.

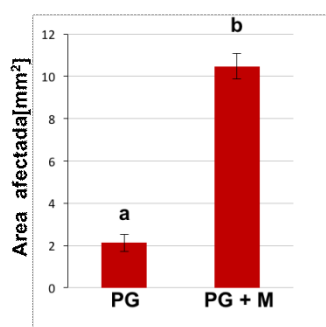


Figura 4.XV. Toxicidad de los sobrenadantes ultrafiltrados provenientes del desarrollo de CIDEFI 212 en medio papa glucosa (PG) y en medio suplementado con macerado de hoja (PG + M) luego de 7 días de crecimiento. Las letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas respecto al control ($p < 0.05$, Test de Tukey).

Se realizó un análisis de la varianza trifactorial (aislado, medio de cultivo y tiempo de cultivo) donde se comprobó que las tres variables están asociadas, como se presenta en la tabla 4, ya que los valores de p son menores a 0.05.

Tabla 4. Análisis de la varianza del diseño trifactorial (SC tipo III) aislado, medio de cultivo y tiempo realizado con el software InfoStat.

Variables independientes	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	p-valor
Modelo	1981,81	15,00	132,12	0,001
Aislado	486,24	3,00	162,08	0,001
Medio	121,85	1,00	121,85	0,001
Día	50,99	1,00	50,99	0,001
Aislado*Medio	342,52	3,00	114,17	0,001
Aislado*Día	371,77	3,00	123,92	0,001
Medio*Día	105,98	1,00	105,98	0,001
Aislado*Medio*Día	310,31	3,00	103,44	0,001
Error	1522,88	357,00	4,27	
Total	3504,70	372,00		

En la tabla 5 se presentan los resultados del Test de Tukey que se realizó con los valores obtenidos en el análisis de la varianza correspondiente al diseño trifactorial, donde se observan las diferencias significativas entre los diámetros de las lesiones provocadas por los sobrenadantes del aislado CIDEFI 212, acorde con lo presentado en las figuras 4.XIV y 4.XV.

Tabla 5. Comparación de las medias del área de las lesiones para todas las interacciones trifactoriales (N=27).

Muestra	Medio	Día	Media	Agrupamiento
PG	PG	14	1,12	A
PG + M	PG + M	7	1,34	A
CIDEFI 216	PG	7	1,40	A
PG	PG	7	1,44	A
PG + M	PG + M	14	1,85	A
CIDEFI 216	PG + M	7	1,12	A
CIDEFI 216	PG + M	14	1,36	A
CIDEFI 213	PG	7	1,49	A
CIDEFI 213	PG	14	1,60	A
CIDEFI 212	PG	14	1,93	A
CIDEFI 212	PG	7	2,12	A
CIDEFI 212	PG + M	14	2,19	A
CIDEFI 213	PG + M	7	2,33	A
CIDEFI 213	PG + M	14	2,32	A
CIDEFI 216	PG	14	3,03	A
CIDEFI 212	PG + M	7	10,48	B

5. Discusión

El crecimiento diferencial que se encontró cuando los aislados CIDEFI 212, CIDEFI 213 y CIDEFI 216 crecieron en AV8 fue similar al reportado previamente por Franco y col. (2017) cuando estudiaron el crecimiento de los aislados en medio en APG. Estos investigadores describieron que el crecimiento radial del aislado CIDEFI 212 fue menor que el observado para los aislados CIDEFI 213 y CIDEFI 216 luego de 7 días de cultivo. De modo análogo a lo encontrado en este trabajo de tesis, Franco y col. (2017) en su trabajo describieron que los aislados CIDEFI 212 y CIDEFI 216 se encuentran en un subcluster acorde a su perfil genético, y que el aislado CIDEFI 213 se relaciona con los otros dos aislados con un menor índice de similitud.

A partir del análisis de los resultados fotoquímicos se puede decir que los medios de cultivo PG y PG suplementado con macerado de hojas tienen componentes cuyos máximos de absorción se encuentra alrededor de los 270 - 275 nm, y que los mismos fluorescen en la región λ_{exc} 250 - 425 nm/ λ_{em} 260 – 550 nm.

El sobrenadante del aislado CIDEFI 212 mostró una región de absorción entre 400 y 470 nm luego de 7 días de crecimiento en medio PG. Esta región presentó un ancho de base más amplio (370 - 500 nm) luego de 14 días y se observó en los sobrenadantes provenientes de los tres aislados. La presencia de esta región de absorbancia se podría relacionar con el descenso de la fluorescencia en las regiones λ_{exc} 230 - 300 nm, dado que mientras más compuestos no fluorescentes solubles sean capaces de absorber energía de excitación, el rendimiento de fluorescencia es menor. Además, la fluorescencia es una característica propia de cada molécula, por lo que compuestos de distinta naturaleza química fluorescen con distinta intensidad y en diferentes regiones (Gara y col., 2011; Medina y col., 2018). Los resultados presentados en esta tesis sugieren que los compuestos responsables de la absorbancia en la región 370 – 500 nm no son fluorescentes o que su fluorescencia se

ve solapada por la fluorescencia de compuestos del medio de cultivo. Resulta interesante el hecho de que únicamente los sobrenadantes que mostraron las dos regiones de absorbancia provocaron la aparición de síntomas en el ensayo de hoja desprendida. Li y col. (2017) encontraron que los pigmentos producidos por *Stemphylium lycopersici* mostraron espectros de absorción característicos de compuestos derivados de antraquinona polihidroxilados, con máximos de absorción en 225, 270 y 445 nm, similar a lo encontrado en esta tesis.

Los sobrenadantes ultrafiltrados de cultivos CIDEFI 212, de 7 días, y de CIDEFI 213, de 14 días, en medio PG suplementado mostraron máximos de absorción entre los 270 y 290 nm, cuyo ancho de base y altura fueron distintas a las encontradas en los otros sobrenadantes. Estos sobrenadantes presentaron además una región de absorbancia posicionada entre los 300 nm y 500 nm, y las regiones fluorescentes fueron más definidas que las matrices de fluorescencia, lo que demuestra un cambio en la composición de los sobrenadantes. Esto último podría deberse al consumo de compuestos fluorescentes del medio de cultivo y/o al enriquecimiento de los sobrenadantes en compuestos secretados. En estos estudios, donde se empleó medio de cultivo suplementado con macerado de hojas, no fue posible encontrar relación entre las características fotoquímicas y la toxicidad de los sobrenadantes, probablemente debido a compuestos orgánicos aportados por el macerado, cuyas propiedades fotoquímicas podrían interferir en las determinaciones.

Varias toxinas que participan como factores de virulencia de *Stemphylium spp* poseen absorbancia en las regiones encontradas en esta tesis (Andersen y col., 1995). La Stemfiloxina II posee su máximo de absorción en 277 nm, mientras que la Stemfilina posee absorbancia en varias longitudes de onda, incluyendo 268 nm, donde es máxima y a 331 y 429 nm. La Stemfiloxina II se obtiene por tautomería de la Stemfiloxina I, y muestra fitotoxicidad contra varias especies vegetales, es decir es

huésped-no específica (Singh y col., 2000; Zheng y col., 2010). El Stemfol presenta un máximo de absorción a 273 nm y los compuestos relacionados en 271 nm, y es al igual que la Stemfilina, una toxina huésped-no específica ya que presenta incluso actividad antagónica con bacterias Gram positivas, hongos filamentosos y levaduras (Achenbach y col., 1979). Por otro lado, el Stemfiperilenol posee su máximo de absorción en 291 nm y también absorbe a 291 nm y a 340 nm. Este compuesto es una toxina huésped-no específica con actividad antifúngica. Químicamente es un epoxi derivado de perilenquinonas reducidas (Arnone y col., 1986). Estos compuestos son fluorescentes debido al grado de conjugación molecular (Figura 5.I). Por lo tanto, considerando la presencia de regiones características de absorción, así como los cambios en las matrices de excitación emisión de fluorescencia presentados, los sobrenadantes provenientes de cultivos de los aislados podrían contener mezclas complejas de distinta composición conteniendo los compuestos antes mencionados, entre otros.

Según su capacidad de provocar la sintomatología característica de la Mancha Gris de la hoja, Franco y col. (2017) al inocular folíolos de plantas de tomate susceptibles con una suspensión de conidios (o micelio en el caso de CIDEFI 212, que no esporula) encontraron que el aislado CIDEFI 216 fue el de mayor virulencia, en tanto que CIDEFI 212 y CIDEFI 213 fueron menos virulentos. Los resultados obtenidos en esta tesis concuerdan con lo observado, ya que CIDEFI 216 fue el aislado que mostró mayor virulencia en cultivos en PG de 14 días, en tanto que CIDEFI 212 y CIDEFI 213 demostraron ser menos virulentos ya que generaron manchas necróticas más pequeñas. Además, luego de 7 días de cultivo, independientemente del medio empleado, únicamente CIDEFI 212 provocó la sintomatología característica en folíolos, siendo de mayor el efecto cuando el aislado creció en medio suplementado con macerado de hoja. Estos resultados indican que este aislado secretó factores de

virulencia en tiempos cortos, lo que además fue estimulado por la presencia de los compuestos vegetales del macerado de hoja, que también estimularon la producción temprana de factores de virulencia en el aislado CIDEFI 213.

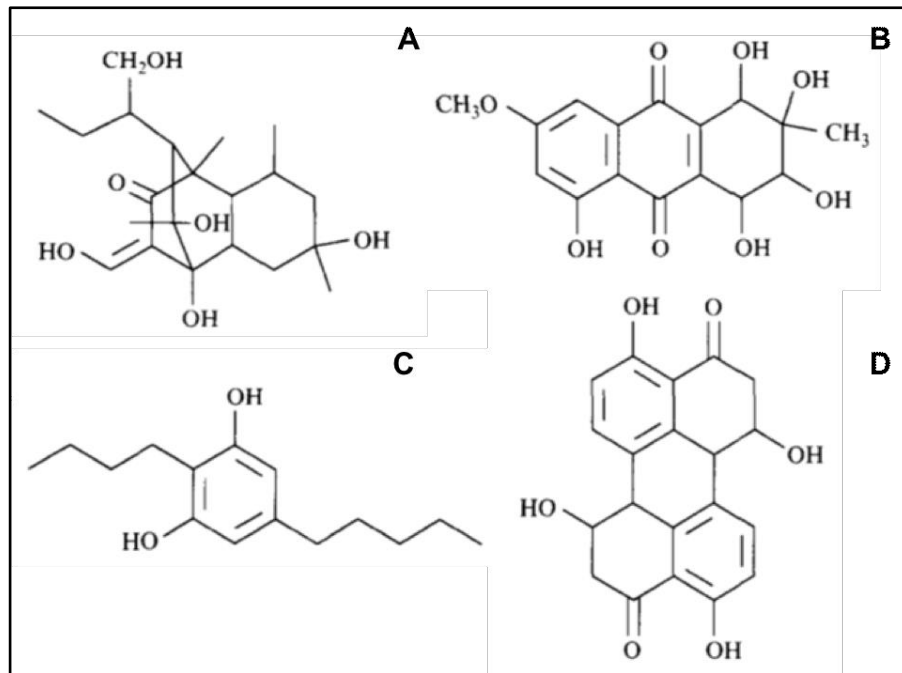


Figura 5.I. Estructura química de toxinas de especies de *Stemphylium* descritas por Andersen y col., 1995. A). Stemphyloxin II. B). Stemphylin. C). Stemphol. D). Stemphyperlenol.

Teniendo en cuenta los resultados presentados y los publicados previamente (Franco y col. 2017), la sintomatología desarrollada en los ensayos de hoja desprendida se atribuyó en parte a factores de virulencia que fueron secretados por los aislados. Estos factores solubles, independientemente de su fuente de producción, generaron los síntomas equivalentes a los característicos de la Mancha gris de la hoja de tomate, en ausencia de otros factores de virulencia que pudieran haber sido inducidos en el hongo durante la interacción compatible.

6. **Conclusiones**

Stemphylium lycopersici secreta metabolitos secundarios, entre los que hay algunos que son factores de virulencia que interaccionan con la planta de tomate.

Los factores de virulencia se inducen con moléculas que libera la planta, interacción que parece ser específica.

El medio y el tiempo de cultivo condicionan la producción y secreción de metabolitos solubles.

El crecimiento, la variabilidad genética y la virulencia de los sobrenadantes no están asociados.

7. **Bibliografía**

Achenbach, H., Kohl, W., y Kunze, B. (1979). Investigations on metabolites of microorganisms. 19. synthesis of some antibiotically active 2, 5-dialkylresorcinols-synthesis of the antibiotics db-2073 and stemphol. *Chemische berichte-recueil*, 112(5), 1841-1848.

Agrios, G. N. (2005). "Plant Pathology". 5ta edición. pp 4- 44.

Andersen, B., Solfrizzo, M., y Visconti, A. (1995). Metabolite profiles of common *Stemphylium* species. *Mycological Research*, 99(6), 672-680.

Argerich, C., y Troilo, L. (2011). Manual de Buenas Prácticas Agrícolas en la cadena de tomate (No. Q02 ARG 18460). Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Buenos Aires (Argentina) FAOINTA. pp 16-120.

Arnone, A., Nasini, G., Merlini, L., y Assante, G. (1986). Secondary mould metabolites. Part 16. Stemphytoxins, new reduced perylenequinone metabolites from *Stemphylium botryosum* var. *Lactucum*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 525-530.

Behare, J., Laterrot, H., Sarfatti, M., y Zamir, D. (1991). Restriction fragment length polymorphism mapping of the *Stemphylium* resistance gene in tomato. *Mol Plant Microbe Interact*, 4, 489-492.

Bernal, R. (2010). Enfermedades de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) en invernadero en las zonas de Salto y Bella Unión. *Serie Técnica. INIA. Montevideo, Editorial Hemisferio Sur SRL*, 181, 1-71.

Blancard, D. (2012). Tomato diseases: identification, biology and control: A Colour Handbook. CRC Press.

Censo Nacional Agropecuario. Secretaria de Agricultura Ganadería Pesca y Alimentación. 2008.

Censo Provincial Hortiflorícola. 2005. Datos comparativos correspondientes a La Plata; Municipios de la Región; y Total Provincia. Municipalidad de La Plata. Disponible en: <http://www.estadistica.laplata.gov.ar/paginas/PDFs/censohortifloricola/CPHFpba.pdf>

- Cieza, R. I. (2004). Asesoramiento profesional y manejo de nuevas tecnologías en unidades de producción hortícolas del Gran La Plata, Argentina. *Scientia Agraria*, 5(1), 79-85.
- Corvo Dolcet, S. (2005). Zonas de Producción del Cultivo del Tomate en la Argentina. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Forestación. Dirección de Agricultura. Disponible en: <http://www.seedquest.com/News/releases/2005/pdf/13528.pdf>.
- Das, T., Majumdar, M. H. D., Devi, R. T., y Rajesh, T. (2017). Climate change impacts on plant diseases. *SAARC Journal of Agriculture*, 14(2), 200-209.
- De Jonge, R., van Esse, H. P., Maruthachalam, K., Bolton, M. D., Santhanam, P., Saber, M. K., Zhang, Z., Usami, T., Lievens, B., Subbarao, K. V and Thomma, B. P. H. J. (2012). Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(13), 5110-5115.
- De Miranda, B. E. C., Boiteux, L. S., y Reis, A. (2010). Identification of *Solanum* (section Lycopersicon) accessions with resistance to *Stemphylium solani* and *S. lycopersici*. *Horticultura Brasileira*, 28(2), 178-184.
- De Wit, P. J., Brandwagt, B. F., Van den Burg, H. A., Cai, X., Van der Hoorn, R. A. L., De Jong, C. F., Klooster, J. van't., Kock, M. J. D. de., Kruijt, Lindhout, W. H., Luderer, R., Takken. F. L. W., Westerink, N., Vervoot, J. J. M y Joosten, M. H. A. J. (2002). The molecular basis of co-evolution between *Cladosporium fulvum* and tomato. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 409-412.
- Debbab, A., Aly, A. H., Edrada-Ebel, R., Wray, V., Müller, W. E., Totzke, F., Zirrgiebel, u., Schächtele, C., Kubbutat, M. H. G., Lin, W. H., Mosaddak, M., Hakiki, A., Proksch, P and Mosaddak, M. (2009). Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum* isolated from *Mentha pulegium*. *Journal of natural products*, 72(4), 626-631.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, C. W. (2015). InfoStat versión 2015I. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba.
- Dice, L. R. (1945). Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species. *Ecology*, 26(3): 297-302.

- Doehlemann, G., y Hemetsberger, C. (2013). Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New Phytologist*, 198(4), 1001-1016.
- Entio, L., y de la Merced Mujica, M. (2016). Evaluation of Tomato Lines Derived from Landraces of "Tomate Platense" and a Commercial Hybrid in La Plata, Argentina. *Journal of Agricultural Science and Technology B*, 78.
- FAO Foodland Agriculture Organization. (www.fao.org). 2013.
- FAOSTAT (2015) FAO. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/browse/rankings/countriesbycommodity/E>. Accessed 2015.
- Farr, D. F., y Rossman, A. Y. (2016). Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture.
- Franco, M. E. E., Troncozo, M. I., López, S. M. Y., Lucentini, G., Medina, R., Saparrat, M. C. N., Ronco, L y Balatti, P. A. (2017). A survey on tomato leaf grey spot in the two main production areas of Argentina led to the isolation of *Stemphylium lycopersici* representatives which were genetically diverse and differed in their virulence. *European journal of plant pathology*, 149(4), 983-1000.
- Gara, P. M. D., Rosso, J. A., Martin, M. V., Bosio, G. N., Gonzalez, M. C., y Mártire, D. O. (2011). Characterization of humic substances and their role in photochemical processes of environmental interest. *Trends. Photochem. Photobiol*, 13, 51-70.
- Gomez, O; Casanova, A; Laterrot, H y Anais, G. (2000). Mejora genética y manejo del cultivo del tomate para la producción en el Caribe. IIHLD. La Habana. pp 159.
- Griffiths, S., Mesarich, C. H., Overdijk, E. J., Saccomanno, B., De Wit, P. J., y Collemare, J. (2018). Down-regulation of cladofulvin biosynthesis is required for biotrophic growth of *Cladosporium fulvum* on tomato. *Molecular plant pathology*, 19(2), 369-380.
- Iglesias, N. (2002). Producción de hortalizas bajo cubierta: Estructura y manejo de cultivo para la Patagonia Norte (No. F01 INTA 17308). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires (Argentina). Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle, Río Negro (Argentina). pp 3.
- Jones, J. B; Zitter, T. A.; Momol, T. M and Miller, S. A. (2014). Compendium of tomato diseases and pests. Second Edition. APS Press, USA. 168 pp.

- Kusajima, M., Okumura, Y., Fujita, M., y Nakashita, H. (2017). Absciscic acid modulates salicylic acid biosynthesis for systemic acquired resistance in tomato. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 81(9), 1850-1853.
- Lamari, L. (2008). Assess 2.0 [recurso electrónico]: image analysis software for plant disease quantification (No. 632.3 L215a). APS Press.
- Li, F., Xue, F., y Yu, X. (2017). GC–MS, FTIR and Raman analysis of antioxidant components of red pigments from *Stemphylium lycopersici*. *Current microbiology*, 74(4), 532-539.
- Marrero, T. A. (2003). Principales plagas y enfermedades de las hortalizas en cultivo protegido. Bases del Manejo Integrado de Plagas. Conferencia del 2do Curso Internacional de Cultivo Protegido. IIHLD, La Habana, CD-R.
- Medina, R., Gara, P. M. D., Fernández-González, A. J., Rosso, J. A., y Del Panno, M. T., (2018). Remediation of a soil chronically contaminated with hydrocarbons through persulfate oxidation and bioremediation. *Science of the Total Environment*, 618, 518-530.
- Nielsen, K. F., y Smedsgaard, J. (2003). Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology. *Journal of Chromatography A*, 1002(1-2), 111-136.
- Ronco L., Rollán C., Larrán S., Mónaco C., Dal Bó E. 2008. Manual para el reconocimiento de Enfermedades: tomate y pimiento. Cinturón Hortícola del Gran Buenos Aires. Ed. Universidad Nacional de La Plata. ISBN 978-950-34-0489-8. pp 50-56.
- Rosa, E. 2007. Conjunto Tecnológico para la Producción de Tomate1. pp 6.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Shah, J. (2009). Plants under attack: systemic signals in defence. *Current opinion in plant biology*, 12(4), 459-464.
- Singh, P., Park, P., Bugiani, R., Cavanni, P., Nakajima, H., Kodama, M., Otani, H., and Kohmoto, K. (2000). Effects of host-selective SV-toxin from *Stemphylium vesicarium*,

the cause of brown spot of European pear plants, on ultrastructure of leaf cells. *Journal of Phytopathology*, 148(2), 87-93.

Tan, G; Liu, K; Kang, J; Xu, K; Zhang, Y; Hu, Lizong, Zhang, H; Li, Chengwei. (2017). Transcriptome analysis of the compatible interaction of tomato with *Verticillium dahliae* using RNA-sequencing. *Frontiers in Plant Science*. 6, 428.

Thomma, B. P., Van Esse, H. P., Crous, P. W., y de Wit, P. J. (2005). *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. *Molecular plant pathology*, 6(4), 379-393.

Vida, J. B., Zambolim, L., Tessmann, D. J., Brandão Filho, J. U. T., Verzignassi, J. R., y Caixeta, M. P. (2004). Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. *Fitopatologia brasileira*, 29(4), 355-372.

Wallroth, C. F. W. (1833). Flora Cryptogamica Germaniae: pars posterior continens Algas et Fungos. Nürnberg (Norimbergae, Sumtibus JL Schragii). Compendium Flora Germanicae Sectio II, Plantae cryptogamicae S. cellulosa scripserunt Math. Jos. Bluff et Carol. Ant. Fingerhath.

Yang, H., Zhao, T., Jiang, J., Chen, X., Zhang, H., Liu, G., Zhang, D., Du, Chong, Wang, S, Xu, X y Li, J. (2017). Transcriptome Analysis of the Sm-Mediated Hypersensitive Response to *Stemphylium lycopersici* in Tomato. *Frontiers in plant science*, 8, 1257.

Zheng, L., Lv, R., Huang, J., Jiang, D., y Hsiang, T. (2010). Isolation, purification, and biological activity of a phytotoxin produced by *Stemphylium solani*. *Plant disease*, 94(10), 1231-1237.